CELLMAX® DUO 中空糸細胞培養システム

取 扱 説 明 書

SPECTRUMLABS.COM
Leading the Way in Bioseparation
ISO 9001:2000 CERTIFIED

Copyright 2009 Spectrum Laboratories, Inc. All Rights Reserved

目次

ご使用の前に（安全情報） 3

CellMax Duoシステムの構成 3

仕様 3

システム概要 4

　ECU操作 4

　フロントパネル 4

　電源接続仕様 4

細胞培養時留意事項 5

　無菌操作 5

　細胞株 6

開始時に必要なもの 6

システムセットアップ 7

モジュールセットアップ 7

　リザーバーボトル・リザーバーキャップの滅菌 7

　リザーバーとフローパスの接続 8

　フローパスとバイオリアクターの接続 9

　バイオリアクター保管液の廃棄 10

前培養 10

　バイオリアクターECSに前培養向け培地を充填する 10

　フローパスを充填する 12

　中空糸バイオリアクターをポンプステーションにセットする 13

細胞移植 13

　ガイドライン 13

　ECSからの前培養培地の除去 13

　バイオリアクター内への細胞移植 14

　一般的な培養手順 14

移植後のフロー速度設定 15

　2種類の液循環速度設定 15

毎日のお手入れ 16

培地交換等のスケジュール 16
培地管理 17
ECSからの細胞含有液回収 18
ECSからの少液量回収 18
細胞／分泌生成物の回収 19
回収後のECS洗浄 19
ECSからの多液量回収 20
追記 21
技術情報 22
中空糸バイオリアクター細胞培養のあらまし 22
細胞株リスト 23
増殖培地の選択 24
一般的考察 25
無血清あるいは無蛋白培養 25
二酸化炭素非依存の培地 26
グルコース消費／乳酸塩生成の速度計算 26
背景 26
グルコース消費速度 26
乳酸塩生成速度 28
引用文献 29

ご使用の前に（安全情報）

- ✓ システムをご使用になる前にこの説明書全体をお読みください。
- ✓ CellMax DuoはAC100～240ボルト、50/60 Hz電源でお使いください。
- ✓ 危険ですので、CellMax Duo本体およびECU（ポンプ速度調整器）のカバーを開けたり分解したりしないで下さい。Duoシステムには一部交換できない部品が使用されています。
- ✓ CellMax DuoやECUを水中に沈めないで下さい。Duo本体は高湿度に耐える仕様になっていますが、防水仕様ではありません。
- ✓ CellMax Duo とECUは8フィートの扁平ケーブルで接続します。ECUをインキュベーター内に置かないでください。ECUはインキュベーター内の環境に対応できるよう設計されていません。ECUボックスをインキュベーター外壁面に貼り付けて使用できるよう、磁石が裏側に付いています。
- ✓ CellMax Duo中空糸細胞培養システムは、哺乳類細胞の連続培養のために設計された、実験用設備です。人や動物の診断・治療に関する用途には使用しないで下さい。
- ✓ 中空糸バイオリアクターは、使い捨て仕様です。1種類の細胞株の培養にご使用ください。実験操作が終了したら、中空糸バイオリアクターモジュールを取り外し、無害化してから廃棄してください。お住まいの自治体等が指示する有害廃棄物の廃棄基準に従ってください。国、地方自治体、所属組織等、関係する組織のいずれの廃棄基準にも違反しないように注意してください。
- ✓ 生物材料に接触した全ての備品は、実験担当者を守るため、感染性因子を含むものとして扱ったり廃棄したりしてください。

CellMax Duoシステムの構成

ご使用の前に、以下のものが全て揃っていることを確認してください。

- CellMax Duo本体
- ECUと電源アダプター
- 電源コード
- テフロンポンプバー（2本）
- 取扱説明書

仕様

寸法	25.4×33.02×16.51 cm
重量	2.25 kg
電源	100～240 V交流、50/60 Hz、0.8A
流速	5～120 mℓ/min * （バイオリアクターがない状態）
モーター	ブラシレス直流モーター
使用環境	20～42℃、相対湿度100%、CO_2インキュベーター（本体のみ）
モーターケーブル	コネクター付　絶縁Cat5ケーブル

＊ 5 mℓ/min以下の流速をご希望の場合は別売りのCellMax Duoかん流キットをお求め下さい。

システム概要

CellMax Duo本体は、2ヘッド式の送液ポンプと台皿で構成されています。台皿には、培養モジュールとリザーバーボトル2組を同時にセットすることができます。

ポンプモーターが回転すると、モーターシャフトのカムがテフロンポンプバーを押し出し、ポンプバーが中空糸バイオリアクターモジュールにつながる肉厚ポンプチューブ部（黄土色部分）を圧迫します。この動作により、培養培地を、リザーバーからガス透過性シリコーンフローパスチューブを経て、中空糸バイオリアクターモジュールへ送ります。

テフロンポンプバーは、前後非対称形で、使用する面を切り替えることにより、異なる流速カーブを得られる仕組みになっています。バーの片側は、チューブとの接触面積を減らすために部分的に欠けた形状をしています。これにより、穏やかな流速が必要な時に、チューブ全体を（小さな径にするために）交換しなければならない手間を減らせます。詳しくは「移植後のフロー速度設定」の章（15ページ）をご覧下さい。

CellMax Duoシステムは、通常、恒温恒湿のCO_2インキュベーター内で使用します。シリコーンチューブの壁を通って二酸化炭素が拡散することにより、循環培地のpHが一定に保たれます。一部の細胞種を除き、細胞の増殖に適したpHに培地を調節するには、CO_2濃度を5.0～10.0%にします。

また、CellMax Duoは、二酸化炭素非依存型培地にもご使用頂けます。ですから、37℃恒温槽や暖かい室内においても使用することができます。

ECU操作

ECUは、扁平ケーブルを介してDuo本体と接続し、ポンプスピードをコントロールしています。ECUは、インキュベーターの外に設置されるので、培養中も速度監視が容易です。また、裏面に付いている磁石により、ECUをインキュベーターの外壁に固定できます。ECU前面のスイッチをオンにすると作動します。オンの間は赤いLEDが点灯しています。ECU前面のダイヤルで幅広い流速を設定できます。

フロントパネル

1. スイッチ：
   オンの時に赤いLEDが点灯し、ポンプに電気が流れます。
2. スピードダイヤル：
   ポンプスピードの調節に使います。高く設定すると、ポンプスピードが速くなり、バイオリアクターへの培地の供給量が増加します。

電源接続仕様

1. AC電源接続アダプター：
   電源からのコードをここに接続します。セットに含まれるコードがお客様のコンセント差込口に合わない場合は弊社カスタマーサービスまでご連絡ください。
2. Cat5扁平ケーブル：
   ECUとDuo本体を接続します。

細胞培養時留意事項

無菌操作

- ✓ 中空糸モジュールによる細胞培養において、長期間高い生産性を維持するには、正しい無菌操作テクニックが欠かせません。手抜き、疑わしい培地の使用、不注意な細胞培養操作は、中空糸バイオリアクターの菌汚染を招きます。
- ✓ 安全な細胞培養技術を実行してください。CellMax中空糸バイオリアクターの初期セットアップの後、無菌操作が必要になるのは、培地交換およびボトルキャップの付け替えのみです。
- ✓ Clave®コネクター表面とリザーバーキャップ／ボトル接続部は、開ける前にいつも必ずアルコールパッドで消毒してください。全ての作業はクリーンブース内で行ってください。
- ✓ 万全を期すために、リザーバーキャップ／ボトル接続部をパラフィルムで覆うことを推奨します。
- ✓ お客様自身が菌汚染の原因とならないようにご注意ください。常に無塵服や無塵グローブを着用して作業してください。
- ✓ クリーンブースを適切に管理してください。清潔で整頓された状態を保ってください。ブース内の気流を乱す原因となる、急速な動作や強すぎる室内の気流設定も避けてください。また、サンプルの風上を手や器具が行き来するような行動も避けるべきです。
- ✓ 二酸化炭素インキュベーター内を清潔に保ってください。培地がこぼれたら必ず拭き取ってください。インキュベーターの内部は、常時スペクトラムクリアーバスのような藻類繁殖防止剤で消毒してください。加湿用水盤には、クリアーバスを添加した滅菌水をご使用ください。
- ✓ 液体の細胞培養培地と添加剤は通常、購入した状態のまま使用可能です。抗生物質、血清、あるいは他の添加剤を培地に添加する際、添加後の培地の無菌性は非常に重要なことです。添加剤入りの培地を使用する際は、必ずご使用前に無菌チェックをして下さい。中空糸バイオリアクター細胞培養に用いる前に、添加剤入り培地のボトル（一部でも可）をインキュベーターに入れ、37℃で1～2日置いてください。
- ✓ 中空糸バイオリアクターについて、液漏れや菌汚染の有無をチェックし、システムを平衡に達させるために、細胞播種前に2～4日間、前培養を行います。培養に用いるのと同じ培地を少なくとも100mℓ入れてください。細胞播種直前に、少なくとも一度、リザーバーとECS（中空糸外部空間）の培地を交換します。
- ✓ 培地、血清、添加物のボトルは、開ける前に必ず室温に戻してください。低温のままボトルを開けると、陰圧により飛沫や汚染源をボトル内に引き込みます。
- ✓ 多少なりとも疑わしい状況が認められる時には、新しい配管、シリンジ、ボトル等を使うようにしてください。汚染のリスクを抱えるよりも、疑わしい培地やどこかに触れてしまったかもしれないピペットを廃棄する方が経済的です。
- ✓ 培地や細胞をシリンジに吸い取る際は、必ず短太針を用いてください。Claveコネクターの外側に培地飛沫や細胞が付着していると汚染を引き起こすおそれがあります。
- ✓ luerフィッティング上に培地が付着した場合には、アルコールパッドで丁寧に拭き取ってください。
- ✓ CellMaxとAC変換器は、穏やかな消毒剤で拭くことができます。消毒のためにアルコールを噴き

つけたり、水中に沈めたり等の処置はしないでください。

細胞株

- ✓ 新しい細胞株を使用する場合、まずマイコプラズマに汚染されていないか確認してください。感染した細胞の形態は通常の細胞とあまり違いがないかもしれませんが、抗体や分泌成分の生成量減少、また、増殖速度の低下というような深刻な問題が発生します。
- ✓ 細胞の中にはクローンによって、増殖特性や分泌レベルが異なる場合があります。できれば、培養前に、クローンレベルで単離した細胞の増殖速度や分泌レベルを確かめてください。
- ✓ 90%以上の生存率で活発に分裂している細胞を用いてください。採取後時間を経た細胞を使用しないでください。バイオリアクターに植付ける前の晩に新鮮な培地を供給してください。
- ✓ 細胞は回収後すぐにバイオリアクターに植付けてください。播種前の細胞を長時間氷の上に置かないでください。
- ✓ 可能であれば、ECSへの細胞播種の際にはConditioned Medium（調製済培地）をご使用ください。培養の難しい細胞や増殖が遅い細胞に対しては、ECS内の血清濃度を20～30%に引き上げると、生存率増加や増殖促進につながります。

開始時に必要なもの

下記のリストは、新しくCellMax Duoを始めるお客様にとって必要になると思われる消耗品等です。別売りのスターターキット（品番：100-145）があれば、すぐに中空糸バイオリアクター細胞培養を始めることが可能です。このリスト以外で必要なものは、液出入りポート付きリザーバーキャップ、ピペット、培地および添加剤です。

- 10、30、50 mℓ Luer-Lokシリンジ　（細胞の回収とECSへの培地供給に）
- アルコールパッド　（luer接続やキャップ／ボトル接続部の消毒に）
- 15ゲージ短太針　（培地や細胞をシリンジに吸い取る時に）
- オートクレーブバッグ〔25.4×38.1cm〕　（キャップ／ボトルの滅菌に）
- 滅菌ラップあるいはアルミホイル　（キャップやluer接続部の覆いに）
- Luer-Lok（オス）　（滅菌済のもの、luerキャップの置き換えに）
- ボトル（125および250mℓ）　（培地のリザーバーとして）

他に、次のような分析機器やキットが中空糸バイオリアクター細胞培養には必要になります。

- グルコースおよびL-乳酸塩分析計
  あるいは　血液グルコース分析計
  あるいは　乳酸塩テスト試薬
- 乳酸塩標準液
  あるいは　血液グルコース分析キット

CellMax Duoシステムセットアップ

1. システムに付着したほこり等を除去するために、Duo本体をアルコールか穏やかな消毒剤で拭きます。Duo本体に直接アルコール(100%)を噴きつけるようなことはしないでください。
2. 扁平ケーブルでDuo本体とECUを接続します。
3. 電源コードでECUを電源に接続します。
4. ECUの電源を入れます。ECUのLED(赤)が点灯します。
5. Duo本体のポンプステーションに2ヶ所あるポンプドア上のドアロックピンを持ち上げ、ポンプドアを開けます。
6. ステーションのポンプバーを指で軽く押し込み、バーが往復運動していることを確認してください。
7. 確認できたら、Duo本体をCO_2インキュベーター内に置いてください。
8. 扁平ケーブルを扉に挟むようにして、すぐにインキュベーターの扉を閉めます。ECUに付いている磁石を利用して、ECUをインキュベーター壁面に固定します。ケーブルは、十分な長さがありますので、背の高いインキュベータの上でも、近くの作業台上でも監視しやすい場所にECUを設置できます。
9. **【注意】 ECUの電源が入っていない状態で、Duo本体をインキュベーター内に長時間置かないでください。**

モジュールセットアップ

中空糸バイオリアクターに細胞を植付ける前に、必ず次の作業を行ってください。

- ✓ リザーバーキャップとボトルを滅菌してください。
- ✓ 滅菌したリザーバーキャップ／ボトルを中空糸バイオリアクターに接続します。
- ✓ 従来タイプの中空糸バイオリアクターを使用される場合、中空糸モジュールとフローパスを接続してください。
- ✓ 本番用の培地を用いて前培養を行ってください。

【注意】 中空糸バイオリアクター培養を成功裏に汚染なしに行うには、正しい無菌操作技術、清浄なインキュベーター、層流の確保されたクリーンブースの使用が欠かせません。

リザーバーボトル・リザーバーキャップの滅菌

スペクトラムではリザーバーキャップのサイズを2種類用意しております。

33mm リザーバーキャップ

- ✓ 細口の清潔なガラス製メディアボトルに使用します。蓋を1回転半だけ締めます。ボトルから蒸気が抜けるように緩いままにしておきます。125mℓガラス製ボトルは、ほとんどのサイズのオートクレーブバッグに収納できます。口径33mmのボトルでしたら、どの容量のボトルにでも使用できます。

38mm リザーバーキャップ

- ✓ 清潔なプラスチック製メディアボトルに使用します。蓋を1回転半だけ締めます。ボトルから蒸気が

抜けるように緩いままにしておきます。125mℓプラスチック製ボトルは、ほとんどのサイズのオートクレーブバッグに収納できます。口径38mmのプラスチックボトルでしたら、どの容量のボトルでも使用できます。

【注意】 38mmのリザーバーキャップは角型プラスチック製メディアボトルにも使用できますが、角型ボトルにはオートクレーブ不可のものがあるので、注意して下さい。

1. 滅菌のため、リザーバーキャップのluer接続部をオートクレーブペーパーやホイルで包み、オートクレーブテープで固定します。
2. オートクレーブバッグにリザーバーキャップ／ボトルを入れ、オートクレーブテープでシールします。
3. 121℃でオートクレーブにかけます。可能であれば、乾燥ステップを含む滅菌プログラムを選択してください。これにより、バッグ内の水滴の量を減らし、オートクレーブ後のバッグが裂けるリスクを減らせます。湿ったオートクレーブバッグは滅菌を保てません。

   【注意】 リザーバーキャップ／ボトルのオートクレーブが不十分だとシステムの汚染につながります。
4. 滅菌終了後、すぐにキャップ等の入ったオートクレーブバッグをオートクレーブから取り出し、クリーンブース内に置き乾燥させます。
5. リザーバーキャップは再使用可能です。使用済み中空糸バイオリアクターを廃棄した後、キャップの汚染除去を行うため、チューブを外します。キャップを非イオン・非毒性薬剤の希釈溶液で洗浄した後、蒸留水中に60分浸し、残った薬剤や汚染物を除去します。再び使用する前にも蒸留水でしっかりすすぎます。

   【注意】 再使用の際にはチューブを取り替えてください。CellMax中空糸バイオリアクターには、そのためのチューブキットが添付されています。

リザーバーとフローパスの接続

<u>全ての作業をクリーンブース内で行ってください。</u>

1. 滅菌リザーバーキャップ／ボトルに入口・出口チューブをフローパスに接続するために、整頓されたクリーンブース内に以下のものを揃えてください。
   - ✓ オートクレーブバッグに入った状態のオートクレーブ済リザーバーキャップ／ボトル
   - ✓ 未開封のCellMax中空糸バイオリアクター
   - ✓ ボトル1本分の増殖培地（あるいは調整済培地）
   - ✓ 滅菌済円錐形遠心分離チューブ（2個）
   - ✓ アルコールパッド（10～20枚）
   - ✓ 滅菌30ccシリンジ（2本）
   - ✓ 滅菌短太針（2本）
   - ✓ はさみ

2. パッケージからCellMax中空糸バイオリアクターを取り出します。
3. オートクレーブバッグからリザーバーキャップ／ボトルを取り出します。入口・出口チューブの接続はキャップのどちらに行ってもかまいません。ですから、チューブのどちらをフローパス入口あるいは出口luer接続につなげても大丈夫です。
4. リザーバーキャップのluer接続口のひとつからオートクレーブペーパーを外します。
5. 2本のシリコーンフローパスチューブのうち片方のluerキャップを外し、ペーパーを外したリザーバーキャップluerに接続します。
6. もう片方のリザーバーキャップluerとシリコーンチューブについても、ステップ4、5項を繰り返して接続します。
7. リザーバーキャップを緩め、滅菌ガラス製ボトルに約125mℓの培養培地を投入します。

【注意】 前培養の際、少なくとも100mℓの本番用培地をご使用ください。フローパスとバイオリアクター内には約35mℓの培地が保持されることにご留意ください。

【注意】 前培養の培地は、実際に培養を行う時の培地と同じ組成にしてください。サイトカインのような高価な成分はこの段階では省くことができます。しかし、実際の培養で血清を添加する場合には血清を加えてください。

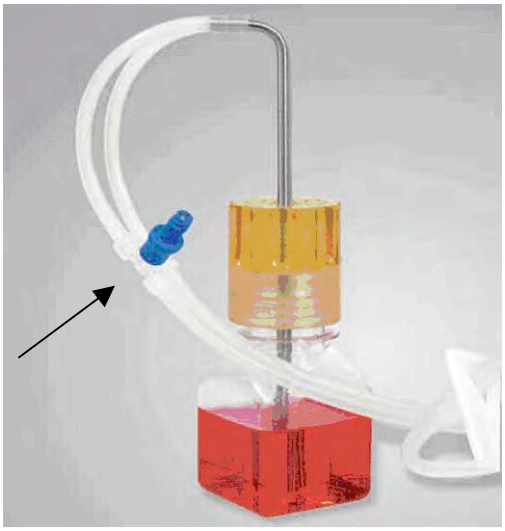


図1： フローパスとリザーバーキャップの接続

フローパスとバイオリアクターの接続

全ての作業をクリーンブース内で行ってください。

スペクトラムは、湿潤済、組立済、即使用可能なバイオリアクターの新製品を販売開始しました。お客様が従来型のバイオリアクターをご購入の場合、フローパスとバイオリアクターが接続されていませんので、下記の手順でフローパスチューブとモジュールの入口・出口を接続して下さい。

1. バイオリアクターの入口・出口、そしてシリコーンチューブの端がそれぞれluerキャップで閉じられ、結束バンドで束ねられていることを確認してください。チューブを傷つけないよう注意しながら結束バンドを切断し、リアクターに接続できるようにしてください。

2. モジュールの入口・出口チューブのスライドクランプを締め、バイオリアクターから液体が流出するのを防ぎます。
3. モジュール入口ポート(左)と、フローパスの入口側チューブ(左)のluerキャップを外し、雄雌luerを無菌的に接続します。
4. モジュール出口ポート(右)と、フローパスの出口側チューブ(右)のluerキャップを外し、雌雄luerを無菌的に接続します。

バイオリアクター保管液の廃棄

全ての作業をクリーンブース内で行ってください。

すでに書きましたが、スペクトラムは、湿潤済、組立済、即使用可能なバイオリアクターの新製品を販売開始しています。お客様が従来型のバイオリアクターをご購入の場合、バイオリアクター内に保管液が入っていますので、下記の手順で保管液を廃棄して下さい。

1. サイドポートチューブからluerキャップを無菌的に外します。

【注意】 luerキャップを再使用する場合、キャップを無菌維持してください。

2. 滅菌済み30ccシリンジをサイドポートそれぞれに取り付けます。片方のシリンジはピストンを引き上げた状態、もう片方のシリンジはピストンを押し込んだ状態で取り付けます。
3. ピストンを引き上げたシリンジのピストンを押し下げてECSに空気を送り込み、反対側シリンジの中に保管液を取り出します。
4. シリンジを外し、廃棄します。

前培養

中空糸バイオリアクターで培養を行う前に、37℃のインキュベーター内で48時間以上前培養を行ってください。ECSとリザーバーボトルの培地は、播種前に1回以上交換して下さい。

播種前に2日以上システムの前培養を行うことは、中空糸バイオリアクター細胞培養を成功させるために、非常に重要なことです。前培養により、バイオリアクターの無菌チェックが行われるとともに、膜壁に残った保管液の除去が行われ、リアクター内環境を細胞の生息しやすい環境条件に整えます。

バイオリアクターECSに前培養向け培地を充填する

ECSへの培地の充填は以下の手順で行ってください。

1. フローパスへの培地の流入を防止するために、リアクター前後のスライドクランプを閉めます。

図2: スライドクランプを閉める

2. アルコールパッドで播種用ポート(Claveコネクター)の表面を消毒します。

図3: 播種口消毒

3. 50mℓ円錐形遠心分離チューブに約25mℓの培地を入れます。培養ディッシュや培養フラスコを使用することもできます。

【注意】 遠心分離チューブから培地や細胞をシリンジに引き入れる時、あるいはシリンジから回収した培地や細胞を移す時には常に短太針を使ってください。

4. 遠心分離チューブから約20mℓの培地をシリンジに吸い取ります(使用するバイオリアクターのECS容量の約1.5倍の量)。

5. 短太針に保護カバーを無菌的に取り付けます。

6. 短太針をシリンジから外し、安全な場所に置きます。

【注意】 保護カバーを付けた短太針は無菌状態が保たれるかぎり、繰り返し使用できます。無菌状態に疑いがあるときには、未開封の新しい短太針をお使いください。

7. 培地入りと空のシリンジをサイドポートのClaveコネクターに取り付け(図4)、シリンジからECSに培地を注入します。同時に、空のシリンジへECSから押し出される空気や培地を引き込みます。Claveコネクターにシリンジを接続する場合、少し力を加える必要があります。必ず、接続できたことを確認してから液注入を行ってください。

【注意】 従来型のバイオリアクターの場合、サイドポートはluer接続口になっています。ポートのスライドクランプで流路を遮断した状態で、無菌操作によりluerキャップを外し、シリンジを接続した後、スライドクランプを開けて培地を注入します(同時に、空シリンジにECS内の空気や既存培養液を抜き取ります)。スライドクランプを閉め、無菌操作にてシリンジを取り外し、luerキャップを閉めてください。luer接続口に培地が付着した場合、アルコールパッドで拭き取ってから閉栓してください。

図4： ECS培地投入

8. ピストン操作により、培地がゆっくりと4、5回ECS内を往復するようにした後、ECSを完全に培地で満たします。ECSの全ての気泡をシリンジに移します。気泡が出て行きにくい場合、システムの右側を上げて傾斜を急にすると効果的です(図5)。

図5： ECS内ガス抜き

9. バイオリアクターのサイドポートにスライドクランプが入っている場合は、クランプを閉めます（ステップ7の注意参照）。

【注意】 前培養の間は、シリンジを接続したままにしても差し支えありません。

10. バイオリアクター入口・出口のスライドクランプを開けます。

11. 全てのluer接続を確認し、必要であれば締め直します。

【注意】 サイドポートにシリンジを付けたままのお客様が多いようです。付けたままにしても細胞の増殖に影響はないですし、バイオリアクターをDuoに接続したり、取り外したりする際の障害になるわけでもありません。シリンジの無菌性に疑いが生じたらすぐに外せますし、luerキャップをするよりも扱いやすいです。

12. luerキャップを再使用する場合は、無菌保持に配慮してください。従来型のCellMaxバイオリアクターをご使用の場合は、サイドポートからシリンジを外し、luerキャップを付けてください。

フローパスを充填する

肉厚ポンプチューブを指でしっかりと圧迫／開放することをくり返し、フローパスとモジュールに培地を

充填してください。気泡がモジュールからスムーズに出て行くように、出口ポート側を持ち上げてバイオリアクターを傾けてください。中空糸バイオリアクターから気泡が流れ出たことを確認して下さい。

中空糸バイオリアクターをポンプステーションにセットする

1. Duoのポンプステーションの片側のドアピンを持ち上げ、ヘッドドアを開きます。
2. 中空糸バイオリアクターの肉厚ポンプチューブ部を扉の内側にセットします。
3. 扉を閉めて、ドアピンがロックされるまで扉を押し込みます。
4. フローパスチューブによじれや曲がりがないことを確認してください。
5. システムを37℃のインキュベーター内で48時間以上、最大流速で運転し、漏れがないことと、無菌性の確認を行います。ECSとリザーバーの培地は細胞播種前に交換してください。
6. 運転開始後15～30分経過すると、モジュールの入口側に気泡が溜まってきます。これらの気泡が残っていると、中空糸上部ECSへの酸素や栄養供給が阻害される場合があります。気泡が溜まってきたら、出口側を持ち上げ、バイオリアクターを傾けて、気泡をリザーバーへ追い出して下さい。

細胞移植

ガイドライン

以下のことは重要ですので必ず守ってください。

- ✓ 生存率が90%以上の活発に分裂している細胞を播種してください。採取後1日以上経過した細胞を播種しないようにしてください。採取予定日の前夜に必ず培地交換をしてください。
- ✓ 採取と播種の間の時間をなるべく短くして下さい。バイオリアクターに播種する前の細胞を長時間氷の上に放置しないでください。
- ✓ 可能であれば、ECSに細胞を播種する時には調製済培地(Conditioned Medium)を用いてください。培養の難しい細胞や増殖速度の遅い細胞に対して、最初の数日間、ECS培地の血清濃度を20～30%に増やすことにより、生着率や増殖速度の改善が期待できます。

ECSからの前培養培地の除去

1. 中空糸バイオリアクター入口・出口ポートのシリコーンチューブ上のスライドクランプを閉じて流路を遮断します。
2. サイドポート上のClaveコネクションの上面をアルコールパッドで拭き清めます。Claveコネクションにそれぞれ空のシリンジ(片方は空気を入れた状態)を接続します。
3. 1本のシリンジから空気をECSに送り込むのと同時に、もう1本のシリンジで前培養培地を抜き出します。
4. 前培養培地が入ったシリンジをポートから外し、短太針を取り付けます。前培養培地を廃液ボトルに廃棄します。すぐに、ECSへ細胞を播種します。液を抜き取ったリアクターを放置すると、中空糸膜が乾いてしまうので注意してください。

バイオリアクター内への細胞移植

滅菌済み50mℓ遠心分離チューブに植付ける細胞を採取します。採取した細胞を遠心分離にかけ、培養上清を除去し、その後播種用培地（調製済、高血清濃度、無血清培地等）に再分散させます。

ECSに細胞を植付けます。

それぞれの中空糸バイオリアクターについて、製品情報欄に推奨できる播種細胞数や液量の記載があるので、ご覧ください。

【注意】培地は中空糸膜によりろ過されますので、細胞植付けの前に必ずバイオリアクター入口・出口ポートのスライドクランプを閉じてください。

【注意】播種後はスライドクランプを開くのを忘れないで下さい。

一般的な培養手順

1. 播種操作中にろ過が進まないよう、入口・出口チューブのスライドクランプを閉じておきます。
2. モジュールECS容積の約1.5倍の体積の調製済培地に、$3.0 \sim 7.0 \times 10^7$ 個の細胞を分散させます。
3. シリンジとサイドポートluer接続との接続部をアルコールパッドで拭き、片方のシリンジを外します。
4. そのシリンジに短太針を取り付け、ゆっくりと細胞分散液をシリンジに引き入れます。
5. 短太針を外し、安全な場所に置きます。

   【注意】保護カバー付きの短太針は、無菌性が保たれているなら、1本の中空糸バイオリアクターの播種操作中、複数回使うことができます。針の無菌性に疑いがある時には、未開封の新しい針を使ってください。
6. ピストン操作により、培地がゆっくりと4、5回ECS内を往復するようにして、細胞を均一に分散させてください。同時に、ECS内の気泡をシリンジ内に追い出してください（図6）。

図6： 播種操作

7. モジュール出口チューブのスライドクランプを開けます。押し出された空気が抜けるようにリザーバーのキャップを1/4回転緩めます。
8. ゆっくりと圧力を加えて、シリンジのピストンを押し、シリンジ内に残っている細胞分散液をECSへ送り込みます。このことにより、余分な培地が限外ろ過され、中空糸内腔からフローパスへ移動し

ます。

9. シリンジ内に細胞や細胞分散液を残さないでください。シリンジ内に残された細胞は短時間で死滅します。死んだ細胞がポート内に残っていると、次にECSから細胞を回収する際に、誤った細胞生存率を計算することになります。

10. 播種終了後空のシリンジを取り外し、Claveコネクターの上面をアルコールパッドで拭き清めておきます。リザーバーキャップを閉めます。旧型リアクターご使用の場合、サイドポートチューブのスライドクランプを閉じ、リザーバーのキャップを閉めます。

    【注意】シリンジをサイドポート(luerあるいはClaveコネクター)に接続したままにして置きたい研究者の方が多いようです。接続したままにする場合、シリンジ内に残った細胞は必ず廃棄してください。

11. あるいは、滅菌済みluerキャップをサイドポートluer接続に付ける場合、シリンジは廃棄し、新しい滅菌luerキャップを取り付けてください。Claveコネクターの付いたバイオリアクターの場合、このステップは不要です。

12. モジュール入口・出口ポートのスライドクランプを開きます。

13. スライドクランプを開き忘れると、細胞に培地が届きません。培地供給が遮断された状態におかれると、30～60分で全ての細胞が死滅します。

移植後のフロー速度設定

CellMax Duoポンプは、0～120mℓ/minのフロー速度を提供できるよう設計されました。

1. 播種後、37℃で約5～10分間、ポンプを起動せずに静置します。この時間は、細胞が中空糸壁に定着するための時間です。

2. バイオリアクターをポンプステーションにセットして、液循環を開始します。移植した細胞数に応じて、最初の24時間は次に示すフロー速度に設定します。

   - ✓ 1.0×10^{7}以下の場合5mℓ/min(ECU目盛1、テフロンポンプバーは小接触面側使用)に設定
   - ✓ $1.0\sim5.0\times10^{7}$の場合、25mℓ/min(ECU目盛4、テフロンポンプバーは小接触面側使用)に設定
   - ✓ $5.0\sim10.0\times10^{7}$以下の場合、50mℓ/min(ECU目盛8、テフロンポンプバーは小接触面側使用)に設定

3. 最初の24時間が過ぎた後は、毎日の乳酸塩生成速度に応じて液循環速度を設定して下さい。

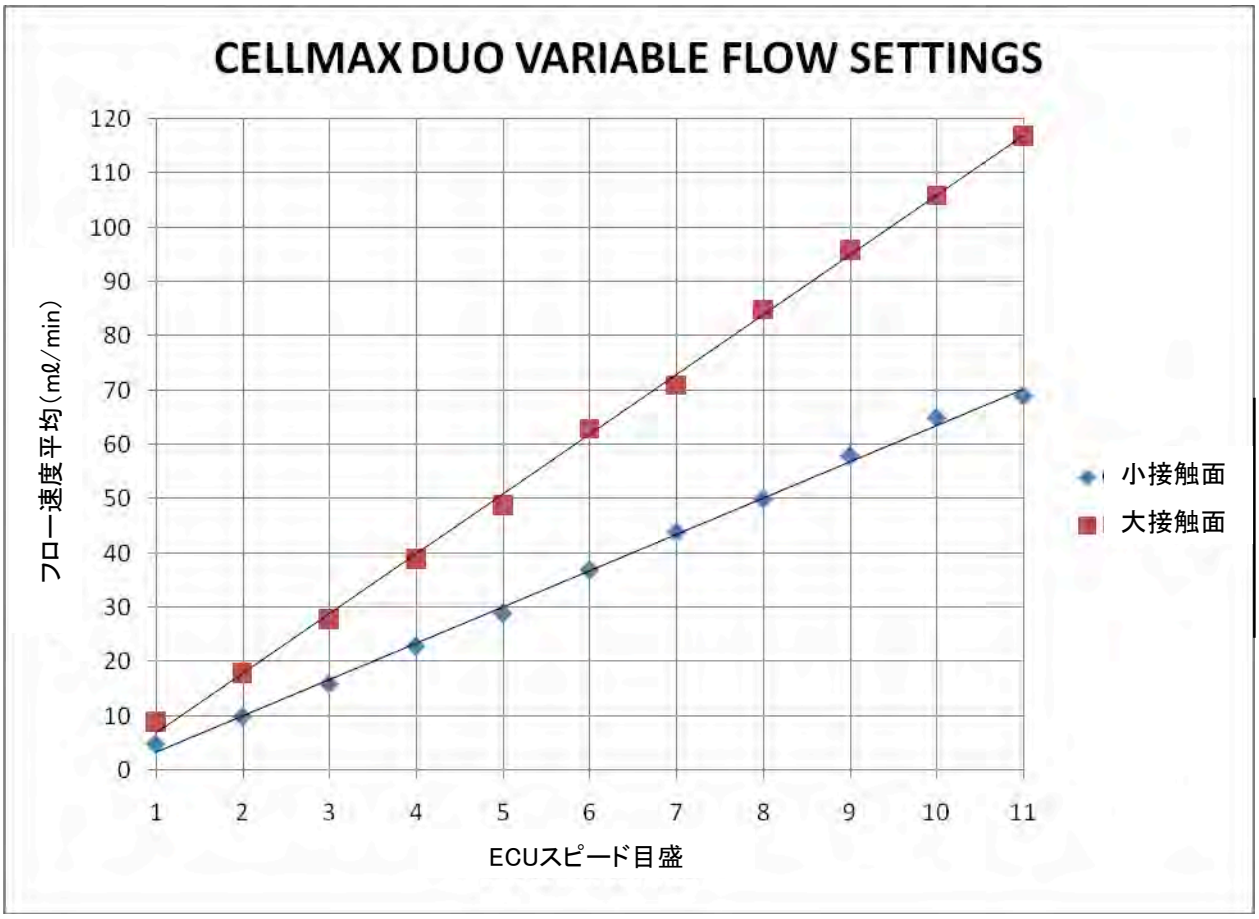
   - ✓ 50mg/day以下の場合、5mℓ/minに設定
   - ✓ 50～200mg/dayの場合、25mℓ/minに設定
   - ✓ 200～2000mg/dayの場合、50mℓ/minに設定

2種類の液循環速度設定

1台のポンプステーションで複数の培養を行おうとする場合、それぞれの培養について最適液循環速度を設定する必要があります。

CellMax Duo細胞培養システムは、それぞれの培養について0～120mℓ/minの液循環速度を提供できるように設計されています。液循環速度は、ECUのポンプ設定と、テフロンポンプバーの設置方向で調節できます。

テフロンポンプバーは非対称です。バーの片側は太く、もう片側はチューブとの接触面積を減らせるよう欠けた形状をしています。太い側は、ストロークの度にその面積全体でチューブを押します。下のグラフの流量曲線は、ポンプバーの方向とECUの速度設定による液流速の関係を示しています。グラフの流速は、バイオリアクターが組み込まれていない時の値です。使用されるバイオリアクターのサイズ（表面積）により流速は若干変化します。



例：

一本目の培養がDuoのポンプステーション #1で行われていて、液流速50mℓ/min（ECU設定5、バー最大接触側）に設定されているとします。二本目の培養をポンプステーション#2で初期細胞数3.0×10^7で開始する場合、植付け後最初の24時間を推奨されている25mℓ/minで行うために、ポンプステーション #2のテフロンバーを小接触面側にセットします。

毎日のお手入れ

培地交換等のスケジュール

細胞株によって、増殖速度や培地消費速度は異なります。ですから、培地添加や培地交換のスケジュールも様々です。細胞の特性に応じて、新しい培地のリザーバーボトルに交換したり、新しい培地を追

加したりしてください。

新しい培地のボトルに交換するための手順:

1. リザーバーキャップ／ボトルの境目をアルコールパッドで拭きます。さらにもう一度、新しいアルコールパッドで拭きます。表面を殺菌することで汚染を防ぎます。
2. リザーバーキャップを緩め、慎重にボトルから外します。

   【注意】リザーバーキャップの液浸金属チューブが、ボトル口外側や他の殺菌していない箇所に触れないように注意して下さい。
3. 予め温めてある新しい培地のボトルにリザーバーキャップの金属チューブを入れ、キャップを閉めます。
4. リザーバーキャップ／ボトルの表面をパラフィルムで覆い、埃などが付着するのを防ぎます。
5. 新しく播種したバイオリアクターについて、最初数日間は125mℓの培地を循環させて、諸代謝因子の蓄積を図ります。この時、培地の全量は160mℓになります(前培養の時の培地がフローパスに35mℓ存在するため)。
6. 再度、125mℓの培地交換を行い、それ以降の培養は500mℓあるいは1000mℓのボトルで行います。多くの場合、開始から7～10日で培地消費量が500～1000mℓ/dayになります。
7. 通常、培地交換の度に培地に含まれる血清濃度を徐々に減らしていくことができます(例:10%→7.5%→5.0%→2.5%)。一般に、血清濃度の下限は1.0～2.0%と考えられます。毎日、グルコースあるいは乳酸塩の濃度をチェックしてください。血清を減らした後、明らかにグルコース消費速度あるいは乳酸塩生成速度が落ちた場合は、血清濃度を1回前の濃度に戻してください。

培地管理

グルコースおよびもしくは乳酸塩の濃度チェックを行い、グルコース消費量およびもしくは乳酸塩生成量の計算を毎日必ず行ってください。

一般的なコメント

グルコースおよびもしくは乳酸塩の濃度を毎日チェックしてください。このチェックにより、細胞の代謝状態と正確な細胞増殖速度を知ることができます。また、グルコース消費およびもしくは乳酸塩生成速度が分かると、培養に必要な培地の量を予想することができます

一般に、中空糸バイオリアクター培養において正常な細胞増殖が行われている場合、グルコース消耗量とそれに伴う乳酸塩生成量は等モルの関係にあります。グルコース濃度が、当初濃度の半分に減少したら培地を交換してください。この説明書の「グルコース消費速度」の章(p.25)をご参照ください。

- ✓ グルコース濃度2.0 g/ℓのRPMI-1640培地の場合、グルコース濃度が1.0～1.5g/ℓになったら培地を交換します。これは、乳酸塩濃度1.0～0.50g/ℓに相当します。
- ✓ グルコース濃度4.5 g/ℓのDMEM培地の場合、グルコース濃度が2.0～1.5g/ℓ(乳酸塩濃度2.5～3.0g/ℓ)になったら培地を交換します。

低分画分子量中空糸バイオリアクター

中空糸の分画分子量(MWCO)が低分子量である場合、バイオリアクターには毎日のメンテナンスと乳酸塩生成速度のチェックが必要です。潜在的な増殖抑制成分や細胞毒成分が、ECS内に高濃度に蓄積する可能性があります。多くの血清蛋白質はECS内から拡散しません。ですから、低分画分子量モジュールでは、通常の培地交換とともにECS内液の交換も考慮する必要があります。

培養初期(1～5日目)、細胞がECSに定着し増殖し始める時期には、特別な培地供給は必要ありません。一度、グルコース消費およびもしくは乳酸塩生成速度が100～300mg/dayに到達したら、3～4日ごとの液交換が必要になります。グルコース消費およびもしくは乳酸塩生成速度が1000～1500mg/dayに到達したら、細胞生存率と分泌速度を最適に保つために、毎日培地交換することを強く推奨します。

高分画分子量中空糸バイオリアクター

低分画分子量中空糸バイオリアクターの場合程頻繁な培地交換の必要はありません。毎日乳酸塩生成速度をチェックすることで、細胞の生理的状態をモニターできます。グルコース濃度が当初濃度の約半分に減少したら培地交換をしてください。

- ✓ グルコース濃度が2.0 g/ℓのRPMI-1640培地の場合、グルコース濃度が1.0～1.5g/ℓになったら培地を交換します。これは、乳酸塩濃度1.0～0.5 g/ℓに相当します。
- ✓ グルコース濃度が4.5 g/ℓのDMEM培地の場合、グルコース濃度が2.0～1.5g/ℓ(乳酸塩濃度2.5～3.0g/ℓ)になったら培地を交換します。

ECSからの細胞含有液回収

ECSからの細胞含有液回収の際に必要な技術と注意事項は、バイオリアクターへの細胞播種の際に説明した内容と同じになります。細胞や分泌生成物の回収についての詳しい説明はCellMaxアプリケーションガイドをご覧下さい。

ECSから細胞およびもしくは分泌生成物を回収する時に、回収量をどれくらいにするのか、という問題があります。少ない液量で回収すると、濃度の高い液が回収されますが回収率は低くなります。多い液量で回収すると、濃度は低くなりますが回収率は高くなります。

例: 1700cm^{2}のセルロース系中空糸モジュールECSからのIgG回収

	ECSからの回収量	IgG濃度	IgG回収量
洗浄1回目	10 mℓ	1.45 mg/mℓ	14.5 mg (56%)
洗浄2回目	12 mℓ	0.65 mg/mℓ	7.8 mg (30%)
洗浄3回目	12 mℓ	0.3 mg/mℓ	3.6 mg (14%)

このように、目的物回収量と目的物濃度(回収の効率)の折衷で回収量を決めることになります。表の数字は一例ですので、お客様ご自身でそれぞれの培養について確かめてから回収量を決めてください。少量回収、あるいは多量回収の手順を以下に説明します。

回収終了後、更に洗浄を行うと、ECS内の過剰な細胞の除去が期待できます。

ECSからの少液量回収

抗体回収の場合、多くの研究者は、1回の培地交換作業での抗体回収を計画するようです。代替案として、ECSを10～20mℓの培地かバッファーで数回洗浄する方法もあります。実際に回収できた量を参

考に回収回数を決めてください。

1700cm^{2}セルロース系中空糸モジュールの場合、1回目のECS回収液(11～15mℓ)に細胞およびもしくは分泌生成物は約60～75%含まれます。2回目の洗浄(15～20mℓ)では更に5～20%回収されます。

細胞の生存率は期待値よりは低く、75～80%になると思われます。細胞が成熟した中空糸バイオリアクター内では、ECS回収の際、細胞が容易に剥離してくるので、まだ細胞がしっかりと中空糸に付着しているリアクターに比べて生存率が低く評価される傾向があります。成熟したバイオリアクター(乳酸塩速度750～2000mg/day)からの毎日の回収は、回収した細胞の高い生存率維持と、分泌生成物の生成量増加につながります。

遠心分離チューブから培地や細胞をシリンジに引き入れる時、あるいはシリンジから回収した培地や細胞を移す時には常に短太針を使ってください。シリンジやサイドポート接続部に培地や細胞が付着することは、確実に汚染を助長します。

luer部に培地をこぼしたり、シリンジやバイオリアクターから培地が漏れたりした時には、滅菌アルコールパッドで丁寧に拭き取ってください。

細胞回収の間、培地の損失を避けるために、必ず液循環ラインを閉じてください。高分画分子量中空糸バイオリアクターでは、培地や低分子成分はサイドポートに取り付けたシリンジの圧力で簡単に膜を透過してしまいます。

細胞／分泌生成物の回収

1. 片方のシリンジでECS内に空気を送りながら、もう片方のシリンジでECS内の細胞分散液をゆっくりと引き抜きます。

   気泡が発生しないように注意してください。また、培地を激しく移動させないでください。

2. 細胞液を取り込んだシリンジを取り外します。旧型のバイオリアクターの場合はサイドポートのスライドクランプを閉じてから、シリンジを外してください。
3. Claveコネクター上面あるいはサイドポートluer部を数枚のアルコールパッドで拭き清めます。
4. 細胞液入りシリンジに、滅菌済み短太針を取り付けます。短太針の保護カバーは無菌状態のまま、クリーンブース内の安全な場所に置いておきます。Microfugeラックはカバーを置くのに良い場所かもしれません。
5. 細胞分散液をおだやかに50mℓ円錐形遠心分離チューブに移します。

回収後のECS洗浄

ECSから少液量回収を行った場合は、リアクター内に細胞が過剰に残っていますので、余分な細胞を除去するために、少なくとも20～30mℓの培地でリンス洗浄を行ってください。中空糸膜上の細胞は急速に増殖します。ECS回収を行う毎に適切な洗浄を行わないと、やがていわゆる閉塞バイオリアクターになってしまうおそれがあります。

1. 50mℓの円錐形遠心分離チューブに25～50mℓの調製済培地を入れます。
2. 20～30mℓの培地をシリンジに引き込みます。

3. 短太針を保護カバーでおおい、シリンジから外します。
4. 無菌性が保たれる場所に置いておきます。
5. シリンジをサイドポートに接続します。シリンジ、針、ポートluer等が菌汚染されないよう注意してください。
6. 旧型リアクターの場合、スライドクランプを開けてください。
7. シリンジにゆっくりと安定した力を加え、ECS内に培地を往復させます。

   気泡が発生しないように注意してください。また、培地を激しく移動させないでください。
8. 旧型リアクターの場合、細胞液を含んだシリンジを取り付けているサイドポートのスライドクランプを閉めます。
9. シリンジをポートから外し、滅菌短太針を取り付けます。保護カバーを外し、無菌状態を維持できるように、クリーンブース内の安全な場所に置いておきます。
10. 細胞分散液をゆっくりと50mℓ円錐形遠心分離チューブに移します。
11. 培地や細胞がシリンジ内に残った状態のままにしないでください。シリンジ内の細胞は短時間で死滅します。死んだ細胞があると、次回のECS回収時、細胞生存率の計算を誤る原因になります。ECS洗浄後、全ての培地および細胞を1本のシリンジに集めます。無菌的にそのシリンジを取り外し、細胞を廃棄します。
12. 旧型リアクターの場合、新たなシリンジまたはluerキャップをサイドポートチューブに取り付け、スライドクランプでポートチューブを閉鎖します。
13. **入口・出口フローパスのスライドクランプを開けます。**
14. CellMaxバイオリアクターをインキュベーター内に戻し、ポンプの電源ケーブルをコンセントに接続します。

    【注意】スライドクランプを開き忘れると、細胞に培地が届きません。培地が遮断された場合、30～60分で全ての細胞が死滅します。

ECSからの多液量回収

- ✓ ECSの洗浄方法については、研究者の都合や細胞株の増殖特性によって、10～25mℓの洗浄を数回行うか、50～100mℓの洗浄を1回行うか選択します。
- ✓ 分泌生成物を高い回収率で回収したい場合、比較的多量の培地（50～100mℓ）を1回で使用します。やや激しく液がECS内を往復するようにして、細胞と分泌生成物を回収します。この場合、リアクター内細胞数が減少しすぎる可能性がありますので、次回の回収については、再び細胞が増殖するのに十分な期間を置きます。
- ✓ 培地や細胞をシリンジに引き入れる時は、常に短太針を使ってください。シリンジやサイドポート接続部に培地や細胞が付着することは、確実に菌汚染を助長します。
- ✓ シリンジサイズは自由です。30ccや60ccのシリンジを好むお客様もいれば、20ccのシリンジを複数使用することを好む方もいます。いずれにしても、シリンジは滅菌済みのものをお使いください。

✓ 培地がこぼれたり漏れたりした場合、滅菌アルコールパッドでluer付近のこぼれた液を丁寧に拭き取ってください。

追記

細胞や生成物の回収は、サイドポートに取り付けたシリンジで行います。完全な細胞回収を行うには、ECSを新鮮な培地で複数回洗浄することが必要です。あるいは、一部の細胞をECSに残し、更に培養を継続することもできます。バイオリアクターパッケージにある注意事項を参照ください。

ECSから細胞分泌物を回収する際の細胞損失は、サイドポートluerに滅菌済みフィルター（孔径0.2～0.5μm）を取り付け、フィルターを通してゆっくりとシリンジに引き入れることで防ぐことができます。あるいは、回収された細胞を遠心分離にかけて、培養培地に再分散後バイオリアクターに戻す方法もあります。

技術情報

中空糸バイオリアクター細胞培養のあらまし

従来、本来3次元構造の組織に生存していた細胞を、培養皿やTフラスコのような2次元のプラスチック表面上に培養するために、適切な培養条件を探索することにより、細胞培養を実現してきました。このような細胞のミクロ環境は、生理学的表現とは言えない「栄養豊富条件か欠乏条件か」という評価で判断され、最適化が試みられてきました。播種後すぐに、細胞は増殖サイクルへの調整段階に入り、その後急速な増殖と培地活用が始まります。このような伝統的手法で培養された細胞の最終増殖段階では、低炭素源／高乳酸の環境に至り、細胞の代謝は著しく低下します。培地交換により、細胞は栄養分が豊富な、しかし細胞自身の分泌成分は減少した環境に置かれ、再び増殖へのプロセスを始めることができます。

CellMax中空糸バイオリアクターにおいて、細胞はモジュールのECSに植付けられ、膜の外壁に定着します。その後、細胞は、培地に含まれた栄養分や酸素が膜壁から拡散してくる中空糸間の空隙で生育します。

細胞の老廃物は、細胞から分泌され、周囲の培地中に拡散します。分泌成分の分子量が膜を透過しない程度に大きい場合、その成分はECSに高濃度にたまっていきます。逆に、分泌成分が分画分子量より小さい場合、成分は中空糸の細孔を通り抜け循環培地中に拡散します。

中空糸バイオリアクター細胞培養においては、中空糸間隙に3次元増殖環境が形成され、細胞同士の接触や、膜を介しての速やかな酸素と栄養成分の供給、および代謝生成成分の分散、リザーバーボトルへの拡散等が行われます。そこでは、分泌された成長因子、個々の細胞特有の諸活性成分、また増殖のフィードバック制御に係る因子等が、相互に影響しあい、ECS内に蓄積され、その結果、生体内環境に似た安定生育環境が保たれることになります。

多くの場合、生理学的に有効な栄養分、酸素、成長因子の濃度組み合わせと物理的支持体の存在、そして老廃物濃度が低く保たれることにより、細胞は増殖を続け、やがてECSの中空糸間の空隙が固形の細胞塊で満たされる状態になります。

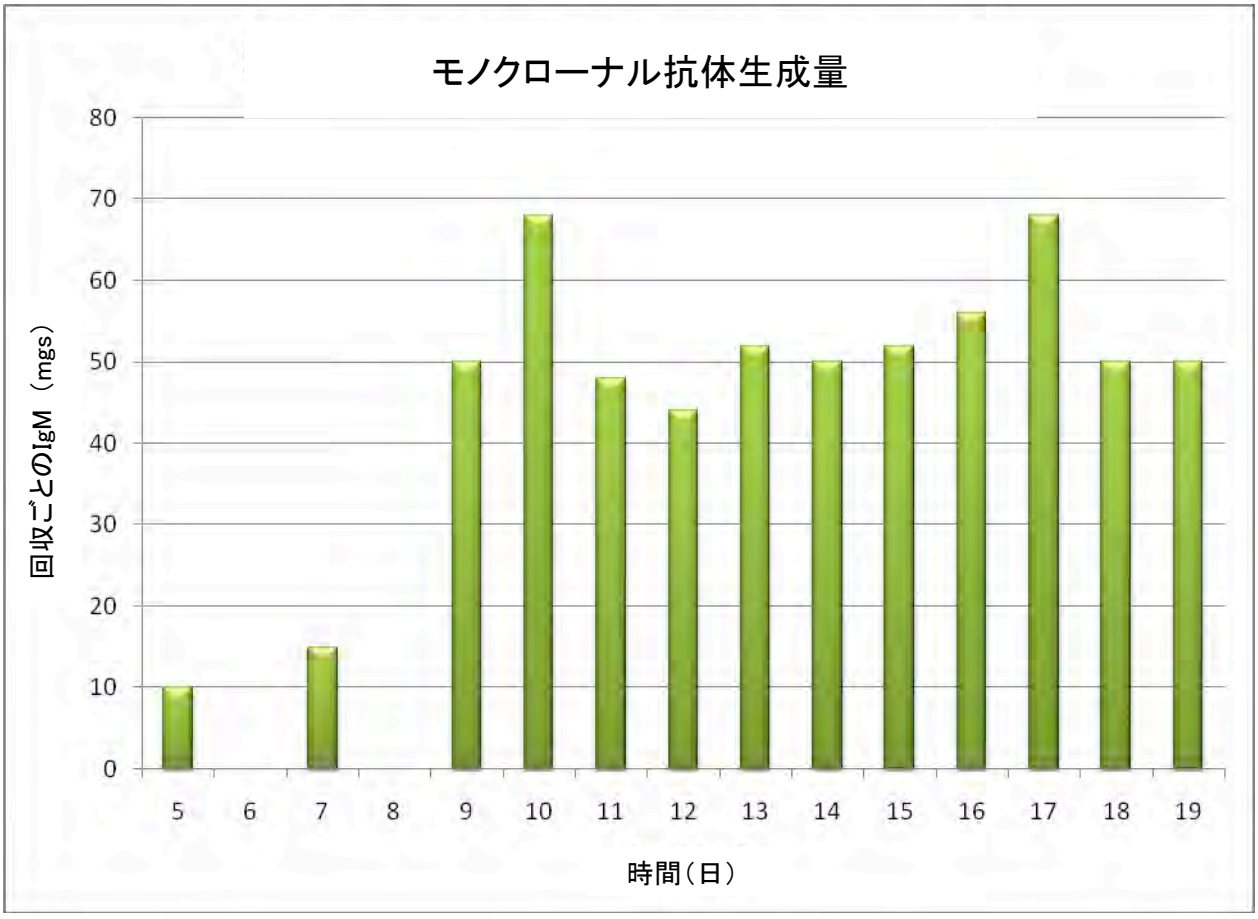
ですから、中空糸バイオリアクターにおいては、細胞のautocrineファクターが蓄積されて、適切な増殖環境が維持されるのです。その結果、細胞に必要な血清（添加分）は通常の1/5から1/10で済みます。一方、細胞が非組み換えであるか組み換えであるかに関わらず、その分泌成分量は10倍以上に増加することが期待できます。

このように、中空糸バイオリアクターで増殖している細胞は、通常の培養と比較して血清要求量が少なく、蛋白質（組み換えあるいは非組み換え）分泌量が高く、高い細胞密度に至り、数ヶ月間培養を維持できるという特性を示します。毎日必要な作業は、リザーバー内液のグルコースおよびもしくは乳酸塩濃度をチェックすることです。培地中栄養成分の減少や老廃物の蓄積が顕著になったら、リザーバー容器を新鮮な培地の入ったボトルに交換することにより培地交換を行ってください。

CellMaxは、普通のCO_2インキュベーター内に設置します。インキュベーター内では、CellMax周辺の空気から、酸素がシステムのシリコーンチューブのガス透過壁を透過拡散することにより、酸素添加とpHの制御が行われています。中空糸バイオリアクターモジュール内の培地がインキュベーター内の温度と空気に対して、平衡に達するのに時間はあまりかかりません。CO_2非依存培地を使用する場合、CellMaxは、恒温（37℃）機能があればあらゆるインキュベーター内で操作できます。

CellMaxバイオリアクターは、コンパクトなのでサンプリングや回収のため、インキュベーターからクリーンブースに移すのも簡単です。細胞およびもしくは分泌成分は簡単にECSから回収できますし、回収細胞数はリンパ細胞の場合バイオリアクター1本で5.0×10^9に達します。

ハイブリドーマ培養からのIgGあるいはIgMの収量は20～60mg/dayに達することが期待できます。ECS内液中に含まれる抗体濃度は1.0～5.0mg/mℓに達し、マウスの腹水に含まれる濃度に匹敵します。さらに、血清を1.0～3.0%に減らすことができたり、あるいは血清を含まない培地や蛋白質を含まない培地に適応させることができたりするので、分泌生成物の精製回収に要する時間を大幅に短縮できます。また、腹水の場合と異なり、日毎の計画的な抗体回収が可能です。



CellMax中空糸バイオリアクターは、幅広いタイプの細胞種について培養実績があります。例：初代培養細胞から継代培養株まで、正常細胞から形質転換細胞まで、壁着性細胞から非壁着性細胞まで、等々。バイオリアクター1本あたり、リンパ細胞で$0.5\sim1.0\times10^9$、ハイブリドーマ細胞で$2.0\sim5.0\times10^9$の細胞を培養することができます。これはT-150フラスコ50～100個分に相当します。

細胞株リスト

CellMax中空糸バイオリアクターで成功裏に増殖できる細胞ラインの一部を示します。

組織	部位	細胞株	種	タイプ	目的物	中空糸
腺癌	Colon	LS174T	ヒト	形質転換	CEA	ポリプロピレン
腺癌	Colon	WIDR	ヒト	形質転換	CEA	セルロース

組織	部位	細胞株	種	タイプ	目的物	中空糸
骨髄		Bone Marrow	ヒト	正常	Cells	ポリプロピレン
骨髄		Osteoblast	マウス	形質転換	Cells	セルロース
癌腫	Breast	MCF7	ヒト	形質転換	Growth Factor	セルロース
胎児		SF9	虫	正常	Cells	セルロース
内皮		primary	ヒト	形質転換	Cells	セルロース
類表皮		A431	ヒト	正常	Proprietary	セルロース
上皮	Mammary	NMuMg	マウス	形質転換	TGF-α	セルロース
上皮	Mammary	C127	マウス	形質転換	Pro-Insulin	セルロース
繊維芽細胞	Embryo	NIH 3T3 (N-Ras)	マウス	正常	Growth Factor	セルロース
繊維芽細胞	Breast	primary	ヒト	正常	Growth Factor	セルロース
繊維芽細胞	Fetal	primary	ヒト	正常	Growth Factor	セルロース
繊維芽細胞	Skin	primary	ヒト	形質転換	Cells	セルロース
繊維肉腫		primary	ラット	形質転換	Hyulornic Acid	セルロース
心臓		Heart	マウス	形質転換	Cells	セルロース
ハイブリドーマ		COL 12	マウス	形質転換	IgG	セルロース
ハイブリドーマ		COX	マウス	形質転換	IgG	ポリプロピレン
ハイブリドーマ		END	マウス	形質転換	IgM	ポリプロピレン
ハイブリドーマ		NOT	ヒト	形質転換	IgM	ポリプロピレン
ハイブリドーマ		TAC 5	マウス	形質転換	IgG	ポリプロピレン
ハイブリドーマ		AA3A	マウス	形質転換	IgG	セルロース
ハイブリドーマ		OKT 1	マウス	形質転換	IgG	セルロース
白血病		Daudl	ヒト	形質転換	Cells	ポリプロピレン
白血病		HL60	ヒト	形質転換	Cells	ポリプロピレン
リンパ球	Breast Tumor	TIL	ヒト	正常	Cells	セルロース
リンパ球	Melonoma	TIL	ヒト	正常	Growth Factor	セルロース
リンパ球	Ovarian Ascites	TIL	ヒト	正常	Cells	セルロース
マクロファージ		U937	ヒト	形質転換	Protein	ポリプロピレン
筋肉		L8	ラット	形質転換	Cells	ポリプロピレン
骨髄腫		J558	マウス	形質転換	IgA	ポリプロピレン
骨髄腫		Transfectoma	マウス	形質転換	Protein	セルロース
骨髄腫		Transfectoma	マウス	形質転換	Protein	セルロース
卵巣		CHO	ハムスター	形質転換	Protein	セルロース

増殖培地の選択

T-フラスコ培養において示される細胞株の増殖特性、すなわち増殖速度、培地消費量、蛋白質分泌特性などは、中空糸バイオリアクター培養における細胞増殖や分泌生成レベルに関する目安になります。T-フラスコ培養において培養が難しいとされる細胞を培養する場合、低いpH（高い乳酸塩濃度）の影響（増殖や生存率に対して）を受けにくい細胞に比べて、多くのメンテナンス作業が必要になります。

中空糸バイオリアクターでの細胞増殖については、T-フラスコや培養皿の場合と比較して、次のような特性が挙げられます。

細胞特有の成長因子等がECS空間内に蓄積される一方、乳酸塩やアンモニウムイオンなどの代謝老廃物は、中空糸内腔に拡散し、ECS環境から排除されます。ですから、細胞は、細胞特有の成長因子に関して自動的に濃度調整されたミクロ環境内に長期間維持されることになります。

多くの細胞株は、血清を10～15%含む培地から、血清を1.0～3.0%含む培地に簡単に適応させることができます。ですから、CellMax培養では、血清使用量を1/5～1/10に減らすことができるのです。

適切なスケジュール（それぞれの細胞株や使用培地により異なります）でメンテナンスが行われるなら、哺乳類細胞株の化学的恒常環境を確立することができます。通常播種から7～10日で、バイオリアクター内は成熟段階に達します。成熟段階では、細胞密度が十分に高くなり、1日に500～1000mℓの培地を消費します。細胞特有の分泌成長因子濃度が十分な濃度に達した結果、血清必要量が顕著に減少します。このような成熟状態に達した中空糸バイオリアクターからは、毎日あるいは2日に1回液回収を行うことができます。非生理的なpH、酸素、栄養分などの条件によって細胞が傷つけられることがないので、CellMax中空糸バイオリアクターモジュールに残っている細胞の一部は培地交換とともに対数増殖を再開します。

一般的考察

同じ細胞ライン、同じ培地で比較するなら、フラスコ、培養皿、撹拌培養、振とう培養のどれよりも中空糸バイオリアクターでの培養が簡単です。それぞれの細胞株やクローン化株は、個々の培地に依存した特有の代謝パターンを示すと思われます。培地を変えると、新しい培地に対応した増殖速度や分泌レベルに変化しますので、その変化を解析するようにしてください。

グルコース消費量およびもしくは乳酸塩生成量（mg/day）として測定される培地消費量は、細胞の代謝活性をモニターする値として採用されてきました。

例えば4.5g/ℓのグルコースを含むDMEMのように、グルコース濃度の高い培地を使用する場合、ボトルあたり、より大きな代謝量が期待できます。しかし、乳酸蓄積により培養液pHが低下するので、HEPES等pH緩衝剤が添加されていない培地使用の場合、グルコース濃度に係わらず、生成乳酸塩濃度が2.0g/ℓを超えないような培地管理を心掛けてください。

無血清あるいは無蛋白培養

ほとんどの細胞株について、個々に指定された培地組成や増殖特性などがあります。したがって、どの細胞にも適用できる、無血清培地（あるいは無蛋白質培地）はありません。新しい培地を使う場合には、必ず細胞増殖、分泌生成物、抗体生成量などに与える影響を確かめてください。

中空糸バイオリアクターに播種する前に、必ず細胞を新しい培地に適応させてください。

増殖速度や蛋白質分泌レベルの測定は、必ず細胞がその培地での増殖に適応した後に行ってください。ELISAあるいは放射免疫拡散法のキットを使えば、簡単、正確に分泌生成レベルを確認でき、培地を選抜にかけることができます。

多くの細胞は、血清を含まない培地に切り替えられてから48時間までは分泌をし続けます。この過程において、生存率の低下はわずかです。回収、遠心分離後の細胞（ペレット状）は、培地に再分散して、再度ECSに植付けることができます。

無血清培地に適応したいくつかの細胞株は、急速な増殖と高い分泌レベルを示すでしょう。これらの細胞の場合、無血清培地で成熟期に達した後、更に同じ培地組成の無蛋白質培地へシフトさせることが可能です。この場合、上記無血清培養と同様の手順で無蛋白質条件による生産を、24～48時間続けることができます。

二酸化炭素非依存培地

CellMax中空糸バイオリアクターシステムは、二酸化炭素非依存培地を用いる細胞培養を成功裏に行える手段として使われてきました。この培地は、細胞が放出した二酸化炭素と、培地成分によるバッファー機能により、増殖に適したpHが維持されます。

細胞を中空糸バイオリアクターに植付ける前に、必ず二酸化炭素非依存培地に適応させてください。バイオリアクターへの播種に際して、比較的多量の種細胞（細胞数：$5.0～8.0\times10^7$）を用意してください。このことにより、中空糸バイオリアクター内において、適切なpHに培地を保つために十分な二酸化炭素を確実に発生させることができます。

乳酸塩生成速度は、二酸化炭素非依存培地中で増殖する細胞の代謝活性を評価するのに使うことができます。乳酸塩分光診断キットは、二酸化炭素非依存培地中の乳酸塩濃度に関する信頼できる測定キットです。

相対増殖速度や分泌生成物（あるいは抗体）生成量などは、細胞株および二酸化炭素非依存培地組成によって異なります。一般に、二酸化炭素非依存培地によるT-フラスコ培養での増殖成績が良好な株の場合、中空糸バイオリアクター培養においても、二酸化炭素依存培地を用いた場合と同じ程度の目的物生産が得られるでしょう。

グルコース消費／乳酸塩生成の速度計算

背景

中空糸バイオリアクター細胞培養において、中空糸の束の内部で増殖する細胞を直接観察することはできません。しかしながら、培地炭素源の消耗や異化生成物の生成をモニターすることにより、中空糸上の細胞増殖を把握することはできます。これらの測定は、細胞の生理学的手法のひとつです。グルコース消費とそれに伴う乳酸塩生成は、細胞増殖の直接的な結果です。

細胞増殖の倍加時間を推測するために、培養開始からの時間（日）を横軸に、1日あたりの乳酸塩生成量（mg）およびもしくはグルコース消費量を縦軸にしてグラフを作成します。片対数グラフ上でのカーブの傾きにより、正確に倍加時間を測定できます。以下に例を示します。

グルコース消費速度

グルコース消費速度の計算式を示します。

グルコース消費速度 $=(V_n\times G_n+V_p\times G_p-V_t\times G_c)/(t_c-t_p)$

V_n = 前回グルコースを測定した時以降、投入された新しい培地の量（ℓ）。

V_p = 前回グルコースを測定した時に、リザーバー、回路、バイオリアクター内に残っていた培地の量（ℓ）。これは加えられた新鮮な培地量を除いた量になります。

V_t = グルコースを最新測定した時の、リザーバー、チューブ、バイオリアクターに存在する培地の全量(ℓ)。

G_n = 新しい培地に含まれるグルコース濃度(g/ℓ)。

G_p = 前回グルコースを測定した時の培地に含まれるグルコース濃度(g/ℓ)。

G_c = 培地に含まれるグルコース濃度の最新値(g/ℓ)。

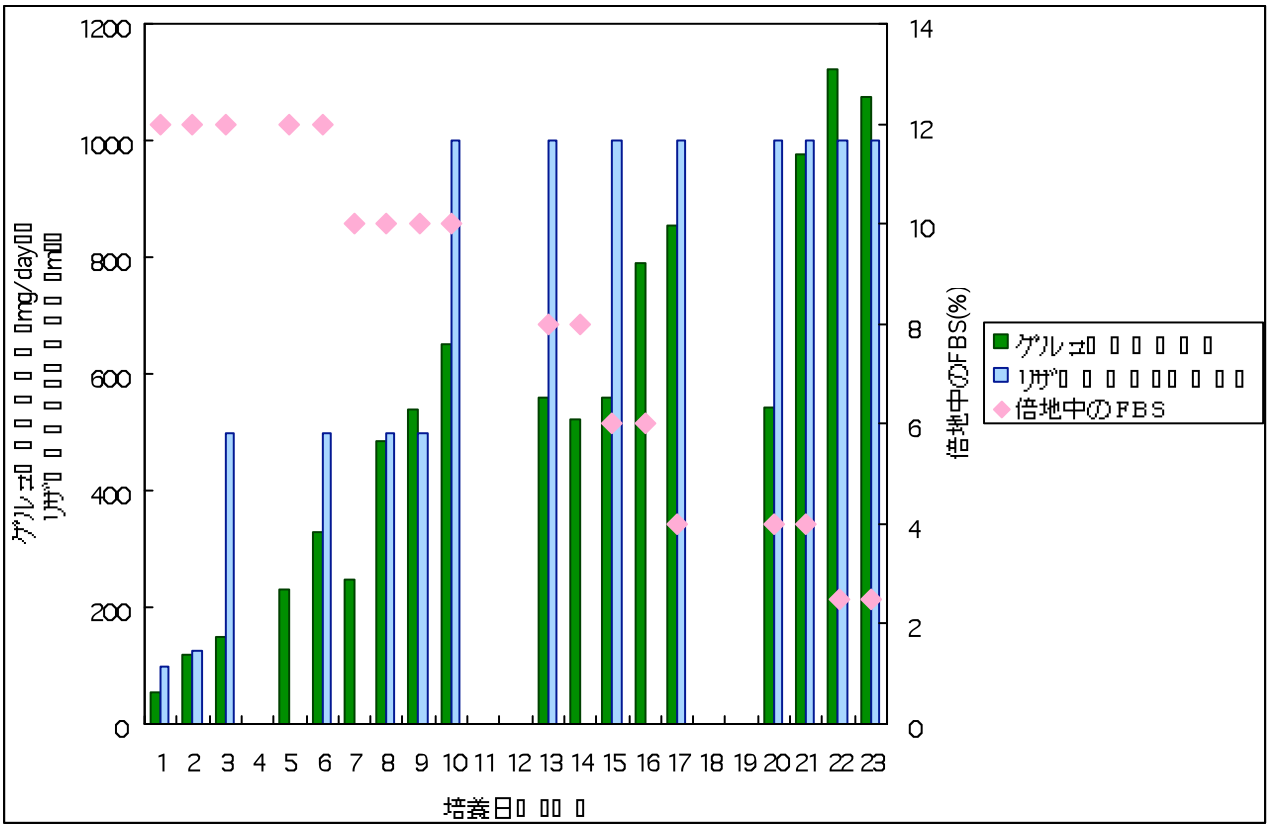
t_c = 培養開始からの経過時間最新値(日)。

t_p = 前回グルコースを測定した時の、培養開始からの経過時間(日)。

例

- CellMaxハイブリドーマ用モジュール430－011
- RPMI-1640、ウシ胎児血清(FBS)、ペニシリン／ストレプトマイシン
- IgM分泌ハイブリドーマ
- 培養開始日にECSに5.0×10^7の細胞を植付け
- TracerⅡグルコースリーダーを使用してグルコース濃度測定

培養日数	グルコース消費速度 (mg/24h)	リザーバーボトルサイズ (mℓ)	培地交換 (mℓ)	倍地中のFBS (%)	ECS回収 (生存細胞数)
1	55	125	100	12	
2	120	125	125	12	
3	150	500	500	12	
5	230	500	NONE	12	1.2E+08
6	330	500	500	12	
7	246	500	NONE	10	
8	486	500	500	10	9.0E+07
9	540	500	500	10	
10	650	1000	1000	10	1.4E+08
13	560	1000	1000	8	1.0E+08
14	521	1000	NONE	8	
15	558	1000	1000	6	1.4E+08
16	790	1000	NONE	6	
17	854	1000	1000	4	1.5E+08
20	542	1000	1000	4	2.1E+08
21	976	1000	1000	4	
22	1123	1000	1000	2.5	1.5E+08
23	1075	1000	1000	2.5	9.0E+07
計	765 mg/day (day 10 +)		10225	650 mℓ	1.2E+09 Cells



乳酸生成速度

乳酸生成速度 = $\{V_t \times L_c - (V_n \times L_n + V_p \times L_p)\} / (t_c - t_p)$

V_n = 前回乳酸を測定した時以降、投入された新しい培地の量(ℓ)。

V_p = 前回乳酸を測定した時に、リザーバー、回路、バイオリアクター内に残っていた培地の量(ℓ)。これは加えられた新鮮な培地量を除いた量になります。

V_t = 乳酸を最新測定した時の、リザーバー、チューブ、バイオリアクターに存在した培地の全量(ℓ)。

L_n = 新しい培地に含まれる乳酸濃度(mg/mℓ)。通常0.03 g/ℓ。

L_p = 前回乳酸を測定した時の培地に含まれた乳酸濃度(mg/mℓ)。

L_c = 培地に含まれる乳酸濃度の最新値(mg/mℓ)。

t_c = 培養開始からの経過時間最新値(日)。

t_p = 前回乳酸を測定した時の、培養開始からの経過時間(日)。

例

この例では、中空糸バイオリアクター培養を、0日目の午後4時に無血清培地120mℓで開始しました。培地はリザーバーに85mℓ、フローパスに35mℓ存在します。

リザーバーの乳酸濃度は、毎日測定されました。

6日目までに、細胞はグルコースを消費し、培地中の乳酸塩濃度は1.08mg/mℓまで上昇しました。新しい培地120mℓをリザーバーに追加し、培地の全量(V_t)は240mℓになりました。

バイオリアクター内の細胞は急速に増殖しました。毎日のメンテナンス作業のひとつとして、翌朝(7日目)に倍地中の乳酸塩濃度を確認しました。乳酸塩の値は0.94mg/mℓで、新たな培地の追加が必要な状況でした。培地を250mℓリザーバーに追加したので、培地の全量は490mℓになりました。

8日目、同様の操作により500mℓの培地を追加しました。

培養日数	時間	培地全量(mℓ)	乳酸塩(mg/mℓ)	培地追加量(mℓ)	乳酸塩速度(mg/day)
0	4:00 PM	120	0	0	---
6	10:00 AM	120	1.08	120	22.5
7	10:00 AM	240	0.94	250	96.0
8	2:00 PM	490	0.88	500	175.7

1日の乳酸塩生成速度:

乳酸生成速度(mg/day) = $\{V_t \times L_c - (V_n \times L_n + V_p \times L_p)\} / (t_c - t_p)$

6日目における最初の乳酸生成速度計算は次のようになります。

$= \{(120 \times 1.08) - (0 \times 0 + 120 \times 0)\} / (5.75 - 0)$

= 22.5 mg/day

7日目の乳酸生成速度は

$= \{(240 \times 0.94) - (120 \times 0 + 120 \times 1.08)\} / (6.75 - 5.75)$

= 96.0 mg/day

注記

- mg/mℓ = g/ℓ
- 血清を含まない培地なので($V_n \times L_n$)はゼロになります。
- 血清を使用する場合、FBS濃度10.0%であれば160mg/ℓ、FBS濃度5.0%であれば80mg/ℓの乳酸塩が培地に含まれます。
- 2回の測定の間で培地を除去していなければ、X回目の$V_p \times L_p$値は、X－1回目の$V_t \times L_c$値と同じになります。

引用文献

1. Pan, D., R. Shankar, D. F. Stroncek, and C. Whitley.; Hum. Gene Ther. 10: 2799-2810, 1999
2. Beck T., L. Schich, S. Sitlani, and M. Menaker ; Focus 17; 2-5, 1994
3. Bradbury MW. ; Exper. Physiol. 1993, 78; 453-472
4. Cancilla PA, Bready J. Berliner J. ; Brain endotherial-astrocytes interactions: The Blood-Brain Barrier Cellular and Molecular Biology. Raven Press pp 25-47

Spectrum Laboratories 日本支社 (Spectrum Japan)

〒520-0105 滋賀県大津市下阪本3-12-18 電話／Fax 077 578 0166

e-mail spectrum.j@gol.com web http://jp.spectrapor.com/